昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, April 2009, 52(4): 406 – 412 ISSN 0454-6296

不同地理种群银杏大蚕蛾 COI 基因序列变异与遗传分化

杨宝山[1,3]，候庆君[2]，王 欢[2]，李喜升[4]，姜德富[4]，刘彦群[2,*]，秦 利[2,*]

（1. 沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110161；2. 沈阳农业大学生物科学与技术学院，沈阳 110161；3. 济南大学城市发展学院，济南 250002；4. 辽宁省蚕业科学研究所 辽宁凤城 118100）

摘要：银杏大蚕蛾 *Caligula japonica* 是亚洲东部的特有种，既是一种重要的林业害虫，也是一种珍贵的野生蚕类资源。为了揭示银杏大蚕蛾地理种群间的内在联系，测定了我国分布的 12 个地理种群的线粒体细胞色素氧化酶 C 亚基 I(COI)基因部分序列(GenBank 登录号：FJ358506 – FJ358517)，对地理种群间的序列变异和遗传分化进行了分析。结果表明：银杏大蚕蛾地理种群间的 COI 序列同源性高达 99% ~100%，显示出比较小的遗传差异。序列对准后从供试 COI 序列中仅鉴定出 9 个变异位点和 6 个单元型，其中 3 种是共享单元型。系统发育分析结果表明种群间已经按地理位置形成了一定的地理格局，AMOVA 分析显示北方组和南方组之间已经具有明显的遗传分化(F_{ST} = 0.478，P < 0.001)。综合分析，我们认为北方组和南方组之间的遗传分化可能与差异巨大的生态条件有关。研究结果为银杏大蚕蛾的种群遗传学和生态学研究提供了一个基本的分子生物学线索。

关键词：银杏大蚕蛾；地理种群；COI 基因；遗传分化；系统发育分析；中国

中图分类号：Q969；Q78 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2009)04-0406-07

Sequence variability of COI gene and genetic differentiation among the geographic populations of *Caligula japonica* (Lepidoptera: Saturniidae) in China

YANG Bao-Shan[1,3], HOU Qing-Jun[2], WANG Huan[2], LI Xi-Sheng[4], JIANG De-Fu[4], LIU Yan-Qun[2,*], QIN Li[2,*] (1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 3. School of City Development, University of Jinan, Jinan 250002, China; 4. Liaoning Sericultural Institute, Fengcheng, Liaoning 118100, China)

Abstract: *Caligula japonica*, an endemic species in eastern Asia, is not only an important forestry pest to be controlled, but also a precious wild silkmoth resource to be domesticated for silk production. In order to clarify the genetic relationship of the geographic populations of *C. japonica*, we determined the 574 bp segment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene sequences from 12 geographic populations in China (GenBank accession no. FJ358506 – FJ358517), and then analyzed the sequence variability of the COI gene and genetic differentiation among them. The identity of COI pairwise sequences was 99% – 100% among the geographic populations of *C. japonica*, which indicated a low genetic diversity. In total, six haplotypes were identified within the sequences, with nine sites showing polymorphism and three haplotypes shared. Molecular phylogeny analysis showed that populations sampled were well divided into "Northern" and "Southern" groups. AMOVA analysis showed that there were apparent genetic differentiation between the "Northern" group and the "Southern" group (F_{ST} = 0.478, P < 0.001). It is inferred that the genetic differentiation between the "Northern" group and the "Southern" group should be related to ecology adaptation of *C. japonica*. The results of this study provide a basic molecular biology clue to the studies on population genetics and ecology of *C. japonica*.

Key words: *Caligula japonica*; geographic populations; COI gene; genetic differentiation; phylogenetic

基金项目：国家自然科学基金项目(30800803)；国家现代农业产业技术体系建设专项(蚕桑)；农业部公益性行业科研专项(nyhyzx07-020-17)；沈阳农业大学青年教师科研基金(20070112)

作者简介：杨宝山，男，1972 年生，辽宁大连人，副研究员，博士研究生，从事有害生物与环境安全研究，E-mail：bshyangjn@163.com

* 通讯作者 Authors for correspondence，E-mail：liuyqlyp@yahoo.com.cn；qinli@syau.edu.cn

收稿日期 Received：2008-10-13；接受日期 Accepted：2008-12-17

analysis；China

银杏大蚕蛾 *Caligula japonica* 又称栗蚕，属鳞翅目大蚕蛾科昆虫，为亚洲东部的特有种。我国广泛分布，在北起黑龙江，南至台湾、海南，东自山东、浙江，西至陕西、云南的广阔区域均有分布，国外分布主要在朝鲜、日本、俄罗斯的西伯利亚及远东沿海地区。该昆虫以卵滞育，雌异配性别（XO型），其 X 染色体是 X 和 Y 染色体融合为一条而成（宋方洲等，1996）；幼虫的食性极杂，可以取食银杏 *Ginkgo biloba*、苹果 *Malus*、梨 *Pyrus*、核桃 *Juglans*、柿 *Diospyros*、杨 *Populus tremula*、桦 *Betula*、栎 *Quercus*、漆树 *Rhus* 等 20 科 30 属 38 种经济林木。

银杏大蚕蛾是一种重要的林业和药用植物害虫，近年在我国一些地区频繁发生，局部地区爆发成灾且有蔓延的趋势。20 世纪 90 年代，在陕西陕南地区严重危害核桃生产，每年直接经济损失 1 000多万元（何曼莉，1999）。2006 年在甘肃陇南地区暴发成灾，受害核桃树 14 万余株，造成直接经济损失 1 500 多万元（辛国和杜文艳，2006）。目前，国家林业有关部门已将银杏大蚕蛾作为林业害虫的主要监测对象加以控制（魏家锋，2006）。

银杏大蚕蛾也是一种珍贵的野生蚕类资源，其丝的价格为柞蚕丝的 10 倍，已引起国际市场的关注。该昆虫的茧为栗棕色、长椭圆形、网目状，可透过网眼看见茧中蛹体。其蚕丝具有独特的荧光闪烁性，荧光反射率高于家蚕和柞蚕丝，在自然光下有鲜明的闪烁性（黄先敏等，2006）。这种天然纤维已作为绢纺原料，纺成绢纱用作昂贵西服面料中花纹的点缀原料和高级商品的防伪标识（董凤春等，2006）。在“九五”和“十五”国家重点科技攻关项目资助下，辽宁省蚕业科学研究所已对其进行了系统的人工驯养研究，并利用核桃楸 *Juglans Mandshurica* 和枫杨 *Pterocarya stenoptera* 成功饲养（张彩华等，2005）。

研究我国不同地区分布的银杏大蚕蛾种群间遗传学关系，可以探索各地区种群间的内在联系，从而为其区域性控制或者野生资源的合理利用和保护提供科学依据。我们实验室已经利用 RAPD 和 ISSR 技术对不同地域银杏大蚕蛾遗传多样性进行了研究，结果发现不同地域的种群已发生遗传分化（曹兰娟等，2007；杨宝山等，2008）。本研究采用 PCR 扩增和测序技术，对我国分布的 12 个不同地理种群的银杏大蚕蛾线粒体细胞色素氧化酶 C 亚基 I（COI）基因部分序列进行了测定和分析，为揭示这些地区分布的种群间的内在联系提供分子生物学方面的证据。

1　材料与方法

1.1　实验材料来源

供试的银杏大蚕蛾于 2007 年 7－8 月分别采自 8 个省区，各种群的采集地见表 1。日本银杏大蚕蛾 COI 基因序列（AB015869）下载自 GenBank 数据库。所采集的银杏大蚕蛾中，除湖北和广西样品的寄主植物分别是银杏和枫杨外，其余样品的寄主植物均是核桃楸。从收集的茧中取出蛹后直接冻存备用。每个种群取 1 个蛹供试。凭证标本存放于沈阳农业大学生物科学技术学院蚕学系，编号 LC001－LC012。

1.2　总 DNA 提取

银杏大蚕蛾蛹总 DNA 的提取参照赵巧玲等（2000）的方法。

1.3　PCR 扩增和序列测定

本研究用于扩增银杏大蚕蛾线粒体 COI 基因 5′端的引物是昆虫线粒体 DNA 扩增的通用引物（Simon *et al.*，1994），由北京赛百胜生物工程公司合成的。两个引物分别为 LYQ3（5′-CCTGGATCTTTAATTGGAGA-3′）和 LYQ4（5′-GGTAAAATTAAAATATAAACTTC -3′）。

50 μL 的 PCR 反应体系包括 2.5 μL 10 × buffer，2 μL dNTPs（2.5 mmol/L），2 μL $MgCl_2$（25 mmol/L），上下游引物各 10 pmol/L，0.5 U Taq 酶（TIANGEN），2 μL 的模板 DNA。PCR 步骤为 94℃ 预变性 3 min；35 个循环包括 95℃ 变性 30 s，50℃ 退火 45 s，72℃ 延伸 1 min；最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测。

PCR 产物纯化后直接进行测序，以 PCR 引物作为测序引物进行双向测序，由天津生物芯片技术有限责任公司完成，利用 Staden Package 软件包完成序列拼接。所测定的银杏大蚕蛾 COI 基因序列已经提交 GenBank 数据库，登录号为 FJ358506－FJ358517。

表 1 供试银杏大蚕蛾的地理种群信息

Table 1 Data of the geographic populations of *Caligula japonica* involved in this study

种群来源 Population source	代号 Code	经度(N)/纬度(E) Latitude/longtitude	凭证标本 Voucher	GenBank 登录号 GenBank accession no.	单元型 Haplotype
黑龙江牡丹江 Mudanjiang, Heilongjiang	HLJ	44°35′/129°34′	LC001	FJ358509	H3
吉林蛟河 Jiaohe, Jilin	JL	43°75′/127°33′	LC002	FJ358510	H5
辽宁宽甸 Kuandian, Liaoning	LNK	40°80′/124°80′	LC003	FJ358517	H3
辽宁凤城 Fengcheng, Liaoning	LNF	40°46′/124°05′	LC004	FJ358513	H3
辽宁岫岩 Xiuyan, Liaoning	LNX	40°30′/123°30′	LC005	FJ358514	H4
辽宁东港 Donggang, Liaoning	LND	39°90′/124°10′	LC006	FJ358516	H3
辽宁庄河 Zhuanghe, Liaoning	LNZ	39°70′/122°96′	LC007	FJ358511	H3
甘肃陇南 Longnan, Gansu	GS	33°70′/105°70′	LC008	FJ358506	H1
湖北恩施 Enshi, Hubei	HB	30°20′/109°40′	LC009	FJ358515	H2
重庆巫溪 Wuxi, Chongqing	CQ	31°42′/109°60′	LC010	FJ358512	H2
贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	GZ	26°56′/106°72′	LC011	FJ358507	H1
广西全州 Quanzhou, Guangxi	GX	25°96′/111°06′	LC012	FJ358508	H1
日本 Japan	Japan	不详 Unknown	不详 Unknown	AB015869	H6

1.4 序列分析方法

用 Clustal X 程序(Thompson *et al.*, 1997)对获得的 COI 基因片段进行序列对齐。用分子进化遗传分析软件 MEGA 3.1(Kumar *et al.*, 2004)进行碱基含量和多态位点分析, 基于 Kimura-2-Parameter (K2P)模型(Kimura, 1980)计算序列间的变异度, 采用邻近距离法(Neighbour-Joining, NJ)(Saitou and Nei, 1987)构建系统树。在所分析物种间的遗传距离比较小时, K2P 模型非常适合用于提供距离矩阵(Nei and Kumar, 2000)。利用软件 DnaSP 3.51 (Rozas and Rozas, 1999)鉴定单元型和估计种群遗传参数。利用软件 Arlequin(Schneider *et al.*, 2000)中的分子变异分析(analysis of molecular variance, AMOVA)估算地理种群分化水平(F-statistics, F_{ST})以揭示遗传分化程度, 用排列测验法(permutation test)检验变异组成及 F_{ST}的显著性。

2 结果

2.1 银杏大蚕蛾 mtDNA COI 基因的 PCR 扩增和序列特征

以总 DNA 为模板, 利用引物对 LYQ3/LYQ4 扩增从所有样品中均得到一条特异 PCR 产物, 且 3 次重复试验均得到单一条带。对扩增产物进行双向测序, 拼接后均得到 574 bp(去除引物序列)。

以所测的辽宁凤城种群的 COI 基因序列(GenBank 登录号为 FJ358513)为例, 对银杏大蚕蛾 COI 基因序列特征进行了分析。结果发现, 该序列与日本银杏大蚕蛾 COI 基因序列(AB015869)的同源性为 99%, 而且序列对齐后并没有发现核苷酸的缺失和插入。氨基酸翻译分析表明, 所测定的银杏大蚕蛾序列的第一个碱基 T 是前一个密码子的最后一位, 共编码 191 个氨基酸。结果表明, 所得序列确来自线粒体 COI 基因片段, 而不是核基因序列(Bensasson *et al.*, 2000)。

所测序列中碱基 T 的含量为 40.42%, C 的含量为 17.07%, A 的含量 28.40%, G 的含量为 14.11%, A+T 含量为 68.82%。密码子第 1 位点的 AT 含量为 59.5%, 第 2 位点的 AT 含量为 59.2%, 第 3 位点的 AT 含量最高, 达到 88.5%。第 3 位点的 G 含量最低, 为 3.6%; T 的含量最高, 为 52%。在密码子的碱基使用频率上, 银杏大蚕蛾与大蚕蛾科的其他蚕类昆虫具有相同的偏好性(数据未出示)。

需要指出的是, 本研究所测的银杏大蚕蛾的 COI 序列与合目大蚕蛾 *Caligula boisduvalii* (EF622227)(Hong *et al.*, 2008)的 COI 序列的同源性也高达 99% ~100%, 序列比对结果见图 1。

2.2 银杏大蚕蛾不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列变异

所测的 12 个银杏大蚕蛾样品以及日本银杏大蚕蛾的 COI 基因片段的序列比对后产生 574 bp 的

对齐序列(图 1)。全部 13 个序列仅鉴定出 9 个变异位点，占所有碱基数的 1.6%，而且全部变异均是发生的转换。全部序列两两之间的同源性高达 99% ~ 100%。这一结果说明，银杏大蚕蛾不同地理种群之间的遗传差异是非常小的。

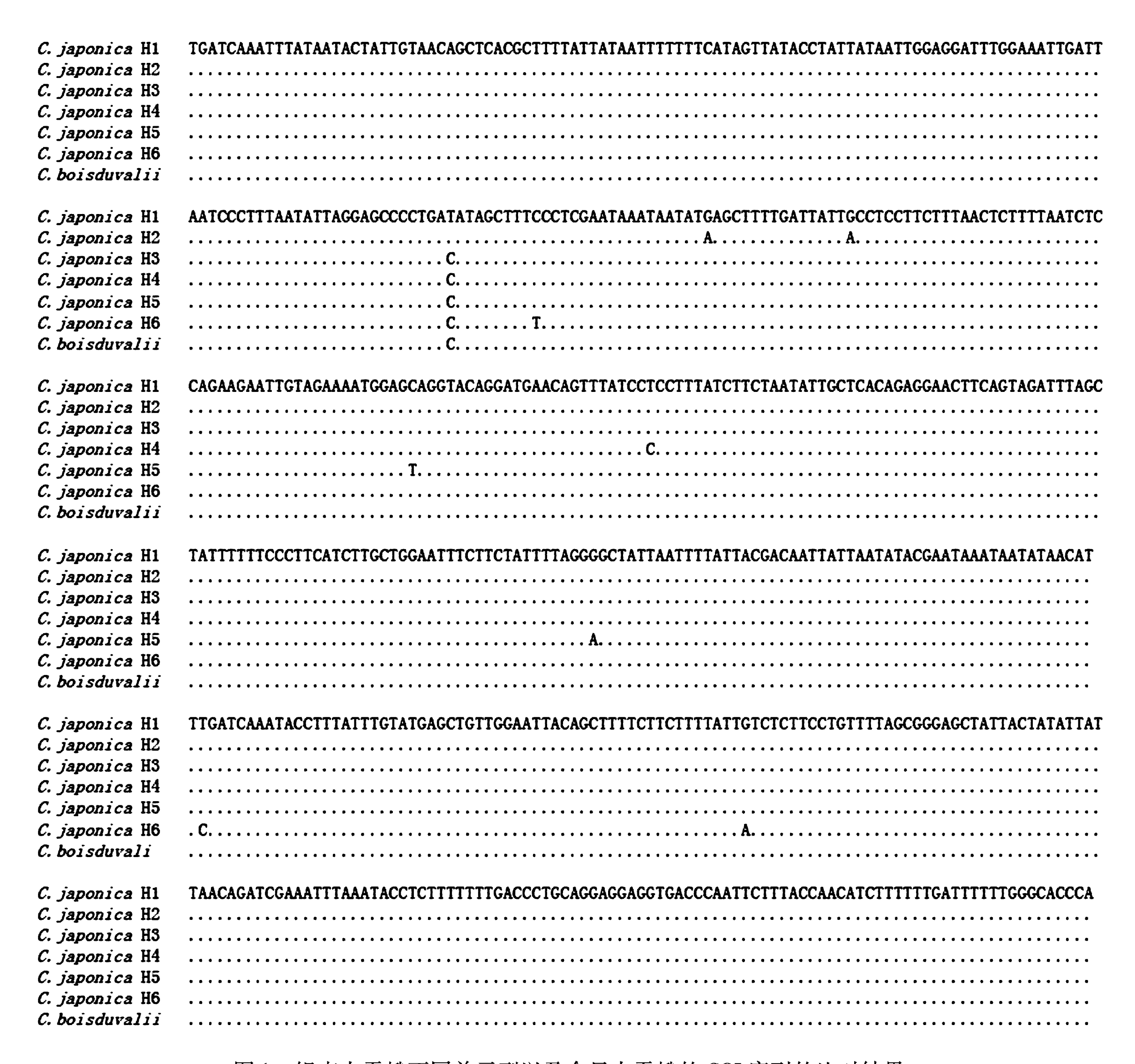


图 1　银杏大蚕蛾不同单元型以及合目大蚕蛾的 COI 序列的比对结果

Fig. 1　COI sequence alignment of the different haplotypes of *Caligula japonica* and *Caligula boisduvalii*

序列全长 574 bp，对齐后仅有 9 个变异位点。*C. japonica* H1 ~ H6 表示银杏大蚕蛾的 6 个单元型(与表 1 一致)，*C. boisduvalii* 表示合目大蚕蛾。"."表示相同碱基。Only nine variable sites were detected from the alignments with a total of 574 bp in length. *C. japonica* H1 – H6 refer to the six haplotypes of *Caligula japonica* as shown in Table 1；*C. boisduvalii* refers to *Caligula boisduvalii*a. The dot means the identical base.

从所测的 12 个银杏大蚕蛾样品中仅鉴定出 5 个单元型，其中 3 种是共享单元型(表 1)。甘肃、贵州、广西的 3 个样品的序列完全一致；重庆和湖北的 2 个样品的序列完全一致；来自辽宁的 5 个样品中，凤城、东港、庄河和宽甸的样品的序列是一致的，岫岩样品的序列与它们有 1 个碱基的差异；黑龙江样品的序列与辽宁凤城样品序列是一致的；吉林样品的序列与辽宁凤城样品序列有 2 个碱基的差异。日本银杏大蚕蛾的序列与辽宁凤城样品间则鉴定了 3 个碱基的差异。

依据 Kimura-2-Paramter 模型计算了银杏大蚕蛾不同单元型的遗传距离(表 2)，不同单元型的平均遗传距离仅为 0.006。我国分布的银杏大蚕蛾单元型间的平均遗传距离是 0.005，辽宁凤城与甘肃以及辽宁凤城与岫岩之间的遗传距离最小(0.002)，吉林与重庆的单元型间的距离最大(0.009)。而它

们与日本银杏大蚕蛾间的平均遗传距离则相对较大，达到0.008。根据单元型的共享情况和遗传距离可以看出，银杏大蚕蛾不同地理种群的遗传距离与它们的地理分布格局有着一定的相关性，即地理分布近的种群，它们的遗传距离较小；地理分布远的种群，它们的遗传距离也较大。

表2 银杏大蚕蛾不同单元型间的遗传距离

Table 2 Genetic distance of the different haplotypes of *Caligula japonica*

	H1	H2	H3	H4	H5
H1					
H2	0.003				
H3	0.002	0.005			
H4	0.003	0.007	0.002		
H5	0.005	0.009	0.003	0.005	
H6	0.007	0.011	0.005	0.007	0.009

2.3 银杏大蚕蛾不同地理种群的系统发育分析

以大蚕蛾科柞蚕属的柞蚕 *Antheraea pernyi* 为外群，根据遗传距离构建了不同地理种群之间的 NJ 树(图2)，按照地理位置 NJ 树大致形成了两个进化枝，分别对应北方组和南方组。北方组包括来自辽宁省的5个样品、黑龙江和吉林的样品各1个，以及日本的样品。南方组包括来自甘肃、重庆、湖北、贵州和广西的样品。虽然由于这些序列间的遗传差异较小，造成 NJ 树中进化枝的置信度较低，但是将这13个地理种群划分为北方和南方两个组的进化分枝仍是可以接受的。这一结果表明，银杏大蚕蛾基本上按照地理位置形成了一定的地理格局。

2.4 银杏大蚕蛾地理种群的遗传分化

从13个银杏大蚕蛾样品的 COI 序列中共鉴定出6个单元型，计算的单元型(基因)多样性 *H* 为0.821，核苷酸多样性 *Pi* 仅为0.0035。系统发育分析将供试13个银杏大蚕蛾 COI 序列划分为北方组(日本的样品归于该组)和南方组，这两个组之间没有共享的单元型，但两个组内均有共享的单元型。北方组的核苷酸多样性 *Pi* 为0.0021，南方组的核苷酸多样性 *Pi* 为0.0026。利用 AMOVA 计算的组间遗传分化程度 F_{ST} 达到0.478($P<0.001$)，说明组间已具有明显的遗传分化。两个组间的 Nei 基因流(Nm)为0.44。

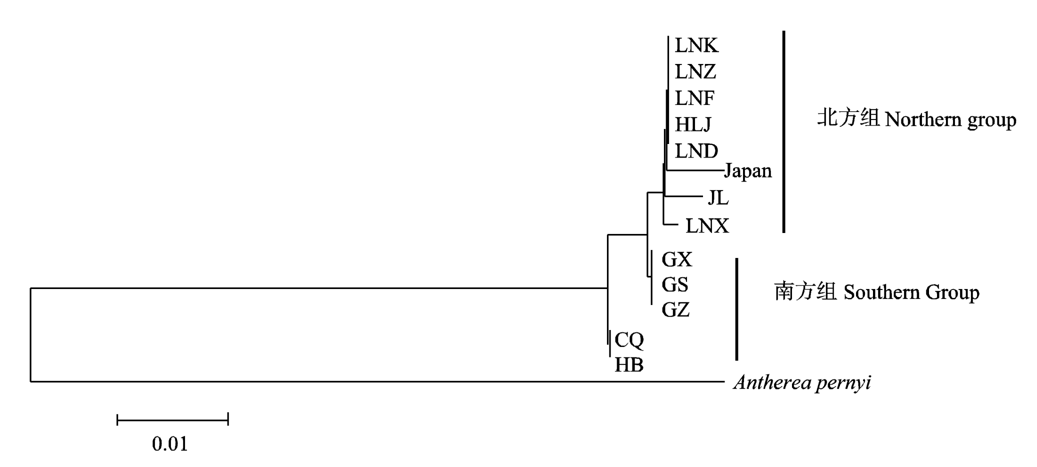


图2 邻接法构建的银杏大蚕蛾 COI 基因的系统进化树

Fig. 2 NJ tree based on the COI gene sequence of the *Caligula japonica* populations

柞蚕是外群对照。支上数据为1 000次重复得到的自引导值。种群代码同表1。*Antheraea pernyi* is the outgroup. Bootstrap values of 1 000 replicates are indicated above the branches. The population codes of *Caligula japonica* were same as shown in Table 1.

3 讨论

本研究基于对 mtDNA COI 基因部分序列的测定和分析，探讨了我国银杏大蚕蛾地理种群间的遗传关系，结果表明地理种群间的遗传差异比较小，初步揭示北方群体和南方群体间已存在比较明显的遗传分化。

本研究发现银杏大蚕蛾 *C. japonica* 的 COI 基因序列与合目大蚕蛾 *C. boisduvalii* (EF622227) (Hong *et al.*, 2008)的 COI 基因序列的同源性高达99% ~100%。本研究所测定的 COI 基因序列的长度为574 bp，与蚕类昆虫的 DNA 条形编码(DNA barcode, 658 bp)(朱绪伟等，2008)有556 bp 的序列是重合的，该部分占到 DNA 条形编码的84%。

DNA 条形编码是一种新的生物分类方法(Hebert *et al.*, 2003a, 2003b)，已经在许多物种上被证明是一个行之有效的手段而用于物种的区别和鉴定(肖金花等, 2004; 王鑫等, 2006)。该 DNA 分类方法主要依据约 600 bp 的 COI 基因序列两两比较的差异度来判断样本关系的远近(肖金花等, 2004)。Hebert 等(2003b)对鳞翅目的研究表明同属各种 COI 序列的平均差异程度是 11.3%，而种内的 COI 序列差异低于 2%。柞蚕 DNA 条形编码的研究也发现不同地理群体的 COI 序列差异低于 2%（朱绪伟等, 2008)。银杏大蚕蛾与合目大蚕蛾之间的序列差异平均为 0.2%(0～0.5%)，在种内差异的范围之内，表明二者应该属于同一个种。由于传统形态学分类将银杏大蚕蛾与合目大蚕蛾划分为两个不同的种，因此，二者的种属关系有必要利用不同的分子标记进行深入的比较研究。

本研究表明银杏大蚕蛾不同地理种群间在线粒体基因组水平上的遗传差异是比较小的，13 个样品间的平均遗传距离仅为 0.006，与只有 400 多年扩散历史的柞蚕不同地理品种间 COI 基因序列的遗传距离(0.002 ～ 0.006)相似(朱绪伟等, 2008)。但是，利用 RAPD 和 ISSR 标记对银杏大蚕蛾不同地理种群遗传多样性的研究均发现具有比较丰富的遗传多样性，种群间最大的遗传距离均达到 0.415(曹兰娟等, 2007; 杨宝山等, 2008)。由于地理上相距甚远的甘肃陇南和广西全州(相距约 1 036 km)，以及辽宁凤城和黑龙江牡丹江(相距约 735 km)的样品均各自有共享的单元型，因此，我们推测银杏大蚕蛾很可能与柞蚕一样是一个近期才扩散的物种。由于扩散的历史较短，在线粒体基因组上积累的变异还很少，表现出的遗传差异就较小。但是，由于一直处于野生状态，在广阔的分布区域受到完全不同的生态条件的选择，在核基因组上已经积累了比较丰富的遗传变异，因而在 RAPD 和 ISSR 标记上就表现出比较丰富的遗传多样性。

本研究表明银杏大蚕蛾基本上按照地理位置形成了一定的地理格局，北方组和南方组群体之间已经具有比较明显的遗传分化($F_{ST}=0.478$, $P<0.001$)。通常认为，$Nm>4$ 表明群体间的基因交流比较充分，若 $Nm<1$ 则表明群体可能由于遗传漂变而发生了分化(Allendorf, 1983)。银杏大蚕蛾的两个组间 Nei 的 Nm 仅为 0.44，表明两个组间基本没有基因交流，也反映了银杏大蚕蛾北方和南方两个组间已经存在了很大程度的遗传分化。由于地理上相距甚远的甘肃陇南、贵州贵阳和广西全州，以及辽宁凤城和黑龙江牡丹江的样品均各自有共享的单元型，因此，作者认为地理隔离不应该是导致银杏大蚕蛾北方和南方两个群体遗传分化的主要原因。通过分析认为，银杏大蚕蛾北方和南方两个群体的遗传分化很可能与差异巨大的生态条件有关。有观点认为，群体分化程度主要是对所在的生态条件相适应的结果，如果生态条件所产生的环境作用强度及方向大体相同，则各分布区内的种群在遗传上将难以形成显著的分化(Kelley *et al.*, 2000)。本研究中，银杏大蚕蛾的南方组种群分别来自属于亚热带气候区的重庆、湖北、贵州、广西和处于亚热带和温带过渡带的甘肃陇南，5 地的银杏大蚕蛾所受的生态环境影响大体相近，它们的遗传分化程度也相应较低。北方组种群的采集地辽宁、吉林、黑龙江均属于温带大陆性季风气候区，大体相近的生态环境也使得它们的遗传分化程度相应较低。但是，北方组和南方组所承受的生态环境则差异巨大，在差异巨大的生态条件下两组间的遗传分化程度也相应较大。

本研究从每个地理种群中仅取了 1 个样品进行了测序分析，在群体的取样数量上有些不足。但从辽宁地区的 4 个样品(分别来自于宽甸、凤城、东港、庄河)中仅鉴定了一个单元型，而且宽甸和庄河之间的地理距离达到 227 km。这一事实表明，虽然本研究在群体的取样数量上有些不足，但这一初步的研究结果仍可在一定程度上反映银杏大蚕蛾地理种群间的遗传差异，可以为银杏大蚕蛾生态学和种群遗传学研究提供了一个基本的分子生物学线索。为了更全面掌握银杏大蚕蛾分布区各地理种群空间分布规律的内在联系，我们将增加样品的数量和所选分子标记的测序长度，以期得到更多的遗传信息，为银杏大蚕蛾的区域性控制和资源合理利用及保护提供更为全面的分子生物学数据。

致谢　本实验在沈阳农业大学园艺学院张志宏教授实验室完成，特致谢意！

参 考 文 献 (References)

Allendorf FW, 1983. Gene flow and genetic differentiation among populations. *Genetics and Conservation*, 18(3): 51－65.

Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM, 2000. Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 314－321.

Cao LJ, Yang BS, Li J, Li M, Wang Z, Yang RS, Qin L, 2007.

Analysis of the *Dictyoploca japonica* with RAPD technique. *Science of Sericulture*, 33 (2) : 293 –296. [曹兰娟, 杨宝山, 李俊, 李敏, 王卓, 杨瑞生, 秦利, 2007. 不同地区栗蚕(*Dictyoploca japonica*)的 RAPD 分析. 蚕业科学, 33(2): 293 –296]

Dong FC, Pan ZJ, Jia YT, 2006. Structure and performance analysis of wild silks. *Silk Monthly*, 3: 18 –20. [董凤春, 潘志娟, 贾永堂, 2006. 野蚕丝的结构和性能分析. 丝绸, 3: 18 –20]

He ML, Fan LG, Chen HX, 1999. *Dictyoploca japonica* harmed to the walnut tree in Hanzhong area. *Plant Protection*, (1): 51. [何曼莉, 范立国, 陈宏绪, 1999. 银杏大蚕蛾在汉中严重危害核桃树. 植物保护, (1): 51]

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313 –322.

Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR, 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270 (Suppl.): 596 –599.

Hong MY, Lee EM, Jo YH, Park HC, Kim SR, Hwang JS, Jin BR, Kang PD, Kim KG, Han YS, Kim I, 2008. Complete nucleotide sequence and organization of the mitogenome of the silk moth *Caligula boisduvalii* (Lepidoptera: Saturniidae) and comparison with other lepidopteran insects. *Gene*, 413: 49 –57.

Huang XM, Liu FY, Ding SX, 2006. Preliminary analysis of fluorescence reflectivity of hand spun silk yarn of camphor silkworm. *Science of Sericulture*, 32 (2): 285 –288. [黄先敏, 刘凤云, 丁素心, 2006. 栗蚕手纺纱荧光反射率初步分析. 蚕业科学, 32 (2): 285 –288]

Kelley ST, Farrell BD, Mitton JB, 2000. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Heredity*, 84 (14): 218 –272.

Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111 –120.

Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150 –163.

Nei M, Kumar S, 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Rozas J, Rozas R, 1999. DnaS Pversion 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174 –175.

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, .4: 406 –425.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L, 2000. A Software for Population Data Analysis (Arlequin). Version 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.

Simon C, Frait F, Bechenback A, Crespi B, Liu H, Flook PK, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 651 –701.

Song FZ, Xiang ZH, Liu SL, Yutaka B, Yutaka K, Katsumi K, 1996. Studies on the sex chromosome of the silkworms *Philosamia cynthia ricini* and *Dictyoploca japonica*. *Acta Sericologica Sinica*, 22 (3): 170 –174. [宋方洲, 向仲怀, 刘绍兰, 伴野丰, 河口丰, 古贺克己, 1996. 蓖麻蚕和栗蚕的性染色体研究. 蚕业科学, 22 (3): 170 –174]

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4 876 –4 882.

Wang X, Huang B, 2006. Advancement of DNA barcoding in animal taxonomy. *Biotech. Bull.*, (4): 67 –72. [王鑫, 黄兵, 2006. DNA 条形编码技术在动物分类中的研究进展. 生物技术通报, (4): 67 –72]

Wei JF, 2006. Fifteen pests endanger the safety of forest resources in Shennongjia area. *Hubei Forestry Science and Technology*, (3): 9. [魏家锋, 2006. 神农架发现 15 种生物危及森林资源安全. 湖北林业科技, (3): 9]

Xia JH, Xiao H, Huang DW, 2004. DNA barcoding: New approach of biological taxonomy. *Acta Zool. Sin.*, 50 (5): 852 –855. [肖金花, 肖晖, 黄大卫, 2004. 生物分类学的新动向——DNA 条形编码. 动物学报, 50(5): 852 –855]

Xin G, Du WY, 2006. No-genernal pollution control of *Dictyoploca japonica* on the walnut tree. *Northwest Horticulture*, (12): 21. [辛国, 杜文艳, 2006. 核桃树银杏大蚕蛾无公害防治. 西北园艺, (12): 21]

Yang BS, Cao LJ, Li J, Li YR, Wang Z, Qin L, 2008. Genetic diversity assessment of *Dictyoploca japonica* from different areas. *Entomological Knowledge*, 45 (3): 418 – 421. [杨宝山, 曹兰娟, 李俊, 姜义仁, 王卓, 秦利, 2008. 不同地域银杏大蚕蛾的遗传多样性. 昆虫知识, 45(3): 418 –421]

Zhang CH, Liu FY, Qi RH, Zuo SC, 2005. Biological characteristics of *Dictyoploca japonica*. *China Sericulture*, 26(2): 50 –51. [张彩华, 刘凤云, 齐荣和, 左士臣, 2005. 栗蚕的生物学特性. 中国蚕业, 26(2): 50 –51]

Zhao QL, Zhang ZF, He JL, 2000. A rapid preparation method of the genomic DNA from *Bombyx mori* pupa. *Acta Sericologica Sinica*, 26 (1): 63 –64. [赵巧玲, 张志芳, 何家禄, 2000. 家蚕蛹体基因组 DNA 的快速制备方法. 蚕业科学, 26(1): 63 –64]

Zhu XW, Liu YQ, Li XS, Huo XM, Jiang YR, Qin L, 2008. Taxonomy status of wild oak silkworm in Yunnan revealed by DNA barcoding. *Science of Sericulture*, 34 (3): 424 –428. [朱绪伟, 刘彦群, 李喜升, 霍锡敏, 姜义仁, 秦利, 2008. 利用 DNA 条形编码探讨云南野柞蚕的分类学地位. 蚕业科学, 34 (3): 424 –428]

(责任编辑: 袁德成)